

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-189672

(P2004-189672A)

(43) 公開日 平成16年7月8日 (2004. 7. 8)

(51) Int. Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/54	A 6 1 K	35/54		2 B 1 5 0
A 2 3 K	1/00	A 2 3 K	1/00	Z	4 B 0 1 8
A 2 3 K	1/16	A 2 3 K	1/16	3 0 4 A	4 C 0 8 5
A 2 3 L	1/30	A 2 3 K	1/16	3 0 4 B	4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/74	A 2 3 L	1/30	A	
審査請求	未請求	請求項の数	7	O L	(全 1 5 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2002-359632 (P2002-359632)		(71) 出願人 000129976			
(22) 出願日 平成14年12月11日 (2002. 12. 11)		株式会社ゲン・コーポレーション			
		岐阜県岐阜市折立296番地1			
		(74) 代理人 100091096			
		弁理士 平木 祐輔			
		(74) 代理人 100118773			
		弁理士 藤田 節			
		(74) 代理人 100101904			
		弁理士 島村 直己			
		(72) 発明者 兒玉 義勝			
		岐阜県岐阜市佐野839番地の1 株式会社			
		ゲン・コーポレーション免疫研究所内			
		(72) 発明者 横山 英明			
		岐阜県岐阜市佐野839番地の1 株式会社			
		ゲン・コーポレーション免疫研究所内			
		最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗下痢症組成物

(57) 【要約】

【課題】 本発明の課題は、下痢症の発症を予防し、並びに下痢症に特有の下痢、嘔吐及び体重減少といった症状を改善するとともに、耐性菌発生の問題もない、下痢症の予防及び治療に有効な組成物を提供することである。

【解決手段】 下痢症病原体若しくは下痢症病原体に由来する抗原で免疫した鳥類が産生した卵又はその処理物、及び生菌剤を含む抗下痢症組成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下痢症病原体若しくは下痢症病原体に由来する抗原で免疫した鳥類が産生した卵又はその処理物、及び生菌剤を含む抗下痢症組成物。

【請求項 2】

下痢症病原体が、ウイルス、細菌及び原虫からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

生菌剤が、乳酸菌である請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む、抗下痢症医薬組成物。

【請求項 5】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む飼料。

【請求項 6】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む食品。

【請求項 7】

ヒト以外の動物に、下痢症病原体若しくは下痢症病原体に由来する抗原で免疫した鳥類が産生した卵又はその処理物と生菌剤とを投与することにより、下痢症を予防又は治療する方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、鳥類が産生した卵又はその処理物及び生菌剤を含有する抗下痢症組成物、該組成物を含む抗下痢症医薬組成物、食品及び飼料、並びに、鳥類が産生した卵又はその処理物及び生菌剤を投与することにより家畜等における下痢症を予防及び治療する方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

下痢症は、ヒト及び家畜のありふれた疾病のひとつであるが、幼弱な個体、特に哺乳期においては脱水症や他の合併症を引き起こし、重篤な事態に至ることが多い。下痢症の原因としては、ウイルスや細菌による感染性のものと環境、ストレス、食餌などによる非感染性のものに分かれるが、とくに感染性下痢症は他の個体へ伝播し、集団全体に多大な被害をもたらすことが多い。

【0003】

感染性下痢症の主要な病原体として、ウイルスと細菌が挙げられる。これらの病原体が食物又は飲料とともに経口的に腸管に侵入し、腸粘膜に定着して増殖することにより発症する。また、2 種以上の病原体が複合感染し、症状をより重篤化することもまれではない。

【0004】

ウイルス性下痢症の病原体としては、ロタウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、ノーウオークウイルス、カリシウイルス、アデノウイルス、アストロウイルスなどが知られている。細菌性下痢症の病原体としては、赤痢菌、サルモネラ菌、病原性大腸菌、毒素原性大腸菌、コレラ菌、腸炎ビブリオ、エルシニア菌、ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、並びにカンピロバクター属、ヘリコバクター属及びクロストリジウム属に属する細菌などが知られている。

【0005】

上記のような病原体によって発症する各種下痢症は、各々の動物において激しい嘔吐及び下痢を引き起こす疾患である。特に腸炎型は初め嘔吐が生じ、数日以内に下痢となり、そして、ときどき血便が生じるとともに、食欲不振、元氣消失、急激な脱水、体温の上昇が認められる場合がある。これらの下痢症のうちの一部に対して、現在、ワクチンが普及している。

10

20

30

40

50

【0006】

しかし、このような下痢症ワクチンは、以前よりその防御効果に問題があった。腸管感染症を防御するにはIgA抗体をいかに産生させるかが重要であるが、現在使用されている不活化ワクチンでは、筋肉内注射するとIgG抗体は産生されるが、腸管内におけるIgA抗体の産生量が少ないため、なかなか所望の効果が得られない。これに対し、生ワクチンを経口投与した場合は、IgA抗体の産生量が多く防御効果も認められるため、主にウイルス性下痢症に対し生ワクチンが用いられているが、その効果は十分とはいえない。また、細菌の場合は、病原性復帰の問題から認められている生ワクチンは少ない。一方、下痢症の治療薬として抗生物質も使用されているが、細菌性下痢症の場合、抗生物質の使用によって耐性菌が発生するという問題がある。さらに、特に家畜飼料中に、発育促進及び下痢予防のために添加されている抗生物質は、環境汚染の点からも問題がある。

10

【0007】

一方、ワクチンとは異なり、経口投与に適した抗体として、鶏卵抗体が知られている。鶏卵抗体を用いた医薬組成物としては、ブタの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌の987P、K88及びK99抗原、及びウシの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌のK99抗原のいずれか1種以上の抗原で鶏を免疫し、この免疫鶏が産生した卵の少なくとも卵黄を含む部分から抗体を回収することにより得られる、前記抗原に特異的なポリクロナール抗体を含有する大腸菌症の経口予防剤及び治療剤が知られている（特許文献1参照）。また、予め食中毒菌を接種した鶏が免疫獲得後に産生した卵の全卵、卵黄又は抗体含有画分を含み、該食中毒菌に特異的な抗体を含有する、食中毒菌抑制材料なども知られている（特許文献2参照）。

20

【0008】

また、犬パルボウイルス感染症のための医薬組成物として、犬パルボウイルスで免疫した鶏の卵黄より得られた抗体を含有する抗パルボウイルス感染症組成物が知られている（特許文献3参照）。また、豚流行性下痢ウイルス感染症のための医薬組成物として、豚流行性下痢ウイルスで免疫した牛から採取される乳又はその乳成分並びに該ウイルスで免疫した鶏から採取した鶏卵卵黄又は鶏卵抗体を含む医薬組成物が知られている（特許文献4参照）。また、家畜、家禽及び愛玩動物の非感染性下痢症及び感染性下痢症に対して効果のある飼料組成物であって、タンニン類と感染性微生物又はこれらが産生する毒素に対する特異的抗体とを併用したものが知られている（特許文献5参照）。

30

【0009】

一方、生菌剤の有用性に関する文献も多数あり、生菌剤が動物の単純性下痢の治療に効果があることを報告している。また、腸管出血性大腸菌の菌体又はトキシノイド化ベロ毒素を抗原として鶏を免疫し、この鶏が産生した卵から得た抗体、と1種以上の生菌剤とを有効成分として含有する、腸管出血性大腸菌感染症の予防剤及び治療剤が知られている（特許文献6参照）。

【0010】

しかし、細菌及びウイルス等による各種下痢症に対して、優れた予防効果を発揮するとともに、下痢症に特有の下痢、嘔吐及び体重減少等の症状を軽減し、優れた治療効果を有するものは知られていなかった。

40

【0011】

【特許文献1】

特許第2034005号

【特許文献2】

特許第2615673号

【特許文献3】

特開平8-259462

【特許文献4】

特開平10-265393

【特許文献5】

50

特開平7-067544

【特許文献6】

特開平10-298105

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、下痢症の発症を予防し、並びに下痢症に特有の、下痢、嘔吐及び体重減少といった症状を改善するとともに耐性菌発生の問題もない、下痢症の予防及び治療に有効な組成物を提供することである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、下痢症病原体を抗原として鳥類を免疫して得られた卵又はその処理物と生菌剤とを含む組成物を動物に投与することによって、上記課題が解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。下痢症病原体を抗原として鳥類を免疫して得られた卵又はその処理物に含まれる抗体は、病原体に付着して病原体を中和することによりその病原性を消失せしめると考えられる。あるいは、病原体の細胞付着因子に付着して病原体が腸管細胞に付着するのを阻止することによりその病原性を消失せしめると考えられる。更に、生菌剤を併せて投与することによって、腸内菌叢が改善されると同時に、上記抗体がより有効に作用し、下痢症の予防及び治療に優れた効果を発揮する。また、生菌剤と本発明の抗下痢症抗体を混合して投与することにより、少量の抗体投与で優れた相乗効果が発揮される。

【0014】

すなわち本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 下痢症病原体若しくは下痢症病原体に由来する抗原で免疫した鳥類が産生した卵又はその処理物、及び生菌剤を含む抗下痢症組成物。

(2) 下痢症病原体が、ウイルス、細菌及び原虫からなる群から選択される、(1)に記載の組成物。

(3) 生菌剤が、乳酸菌である(1)又は(2)に記載の組成物。

(4) (1)～(3)のいずれかに記載の組成物を含む、抗下痢症医薬組成物。

(5) (1)～(3)のいずれかに記載の組成物を含む飼料。

(6) (1)～(3)のいずれかに記載の組成物を含む食品。

(7) ヒト以外の動物に、下痢症病原体若しくは下痢症病原体に由来する抗原で免疫した鳥類が産生した卵又はその処理物と生菌剤とを投与することにより、下痢症を予防又は治療する方法。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明において、下痢症病原体又は下痢症病原体に由来する抗原で免疫する鳥類としては、特に限定されないが、鶏、鶉等が挙げられる。抗体の量産性という観点から、鶏、特に、産卵種を用いるのが好ましい。

【0016】

本発明において下痢症とは、当技術分野において通常用いられる意味を有し、すなわち、液状又は半固体の便が腸から異常に反復排泄されるような症状を意味する。本発明において、下痢症病原体とは、動物において下痢症を引き起こす原因となる細菌、真菌、原虫及びウイルス等の微生物を意味する。下痢症病原体には、これらに限定されるものではないが、ロタウイルス、レオウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、ノーウォークウイルス、カリシウイルス、アデノウイルス、アストロウイルス、ヒストモナスウイルス及びインフルエンザウイルスなどのウイルス；シゲラ属（赤痢菌など）、サルモネラ属（*Salmonella dublin*、*Salmonella typhimurium*など）、エシェリキア属（病原性大腸菌、毒素原性大腸菌など）、ビブリオ属（コレラ菌、腸炎ビブリオなど）、エルシニア属（*Yersinia enterocolitica*など）、ブドウ球菌属（黄色ブドウ球菌など）、シュエドモナス属（緑膿菌など）、カンピロバクター属（*Campylobacter fetus*など）、

10

20

30

40

50

ヘリコバクター属、クロストリジウム属 (*Clostridium perfringens* など)、及びセルプリーナ属 (*Serpulina hyodysenteriae* など)、エーロモナス属 (*Aeromonas hydrophila* など)、プレジオモナス属 (*Plesiomonas shigelloides* など) 及びバチルス属 (*Bacillus cereus* など) に属する細菌; ギアリダ (*Giardia*) 属、アイメリア属 (*Eimeria scabra* など)、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*) 属、トキソプラズマ (*Toxoplasma*) 属、トリコモナス (*Trichomonas*) 属、ペンタトリコモナス (*Pentatrichomonas*) 属、イソスポラ (*Isospora*) 属、エントアメーバ (*Entamoeba*) 属、及びバランチジウム属 (*Balantidium*)、コクシジウム (*coccidium*) 類などの原虫が含まれる。

【0017】

本発明において、下痢症病原体に由来する抗原とは、上記のような下痢症病原体の構成要素の一部からなるペプチドなどを意味し、例えば、下痢症病原体の表面抗原、外膜蛋白質、付着因子、侵入因子、毒素、代謝産物及び病原因子が含まれ、それらの一部からなるものも包含される。本発明においては、このような下痢症病原体に由来する抗原を使用するのが好ましい。下痢症病原体及びこれに由来する抗原は、細胞溶解物等に含まれ、これを精製したもの及び未精製のものの双方を使用できるが、精製したものを使用するのが好ましい。抗原の精製には、硫酸沈殿法、カラムクロマトグラフィー、電気泳動法などの通常の方法を単独又は2つ以上組み合わせる利用できる。また、カラムクロマトグラフィーは1種類のカラムを用いてもよく、2種類以上のカラムを組合わせてもよい。通常のカラムクロマトグラフィーには、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティカラムクロマトグラフィー等が用いられる。

【0018】

より具体的には、本発明の組成物によって予防及び治療できる下痢症、並びにこのような下痢症の原因となる病原体としては、これらに限定されるものではないが、以下のようなものが挙げられる。牛では、ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス (BVDV) による牛ウイルス性下痢・粘膜病、牛コロナウイルスによる牛コロナウイルス病、牛ロタウイルスによる牛ロタウイルス病、牛パルボウイルスによる牛パルボウイルス病、牛エンテロウイルスによる牛エンテロウイルス病、*Clostridium perfringens* による牛エンテロトキセミア、*Campylobacter fetus* による牛カンピロバクター症、*Salmonella dublin*、*S. typhimurium*、*S. enteritidis* などによる牛サルモネラ症、毒素原生大腸菌による子牛大腸菌性下痢、*Cryptosporidium parvum* による牛クリプトスポリジウム症などがある。めん羊では、*Clostridium perfringens* によるめん羊赤痢及びめん羊クロストリジウム症などがある。馬では、馬ロタウイルスによる馬ロタウイルス病などがある。豚では、伝染性胃腸炎ウイルスによる伝染性胃腸炎、豚流行性下痢ウイルスによる豚流行性下痢、レオウイルスによるレオウイルス病、大腸菌による豚大腸菌症、*Salmonella choleraesuis*、*S. typhimurium*、*S. typhisuis*、*S. derby* などによるサルモネラ症、*Serpulina hyodysenteriae* による豚赤痢、*Clostridium perfringens* による豚エンテロトキセミア、*Yersinia enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis* による豚エルシニア症、*Campylobacter mucosalis*、*C. hyointestinalis* による腸腺腫症候群、*Eimeria scabra*、*E. debliciecki* による豚コクシジウム病などがある。犬及び猫では犬パルボウイルスによる犬パルボウイルス病、犬コロナウイルスによる犬コロナウイルス病、猫汎白血球減少症ウイルス (パルボウイルス) による猫汎白血球減少症、猫白血球病ウイルスによる猫白血球病、*Campylobacter jejuni*、*C. coli* による犬カンピロバクター症、*Isospora canis*、*I. ohioensis*、*I. felis*、*I. rivolta*、*Sarcocystis*、*Eimeria*、*Toxoplasma* による犬・猫コクシジウム病、*Toxoplasma gondii* による犬・猫トキソプラズマ病、*Giardia canis*、*G. cati* による犬・猫ジアルジア症、*Pentatrichomonas hominis* による犬・猫トリコモナス病、*Cryptosporidium parvum* による犬・猫クリプトスポリジウム症、*Entamoeba histolytica* による犬・猫アメーバ症、*Balantidium coli* による犬バランチジウム症などがある。鳥類では、Duck virus enteritis virus によるあひるウイルス性腸炎、七面鳥コロナウイルスによる七面鳥コロナウイルス腸炎、ロタウイルスによる鳥ロタウイルス病、出血性腸炎ウイルスによる七面鳥出血性腸炎、鶏パルボウイルスによる鶏パルボウイルス病、七面鳥アストロウイルスによる七面鳥アストロウイルス病、*Yers*

inia pseudotuberculosisによる鳥類仮性結核、Salmonella pollorumによるひな白痢、Salmonella gallinarumによる鶏チフス、Salmonella typhimurium、S. enteritidis、S. sofia、S. thompson、S. blockley、S. heidelberg、S. infantisなどによる鶏パラチフス及び鶏サルモネラ症、Salmonella arizonaeによる七面鳥アリゾナ症、Campylobacter jejuniによる鳥カンピロバクター症、Clostridium colinum、C. perfringens、C. septicum、C. botulinumによる家禽クロストリジウム、Histomonas meleagridisによるヒストモナス病、Cryptosporidium meleagridis、C. baileyiによる鶏クリプトスポリジウム症などがある。人では、ロタウイルスによるロタウイルス症、Salmonella typhimurium、S. enteritidis、S. typhi、S. paratyphiなどによるサルモネラ症、Shigella sonneiによる赤痢、Vibrio parahaemolyticus、V. mimicus、V. fluvialis、V. hollisaeなどによるビブリオ症、Vibrio choleraeによるコレラ、Aeromonas hydrophilaによるエーロモナス症、Plesiomonas shigelloidesによるプレジオモナス症、Clostridium perfringensによるウェルシュ症、Bacillus cereusによるセレウス症、黄色ブドウ球菌による黄色ブドウ球菌症、ロタウイルスによるロタウイルス症、エンテロウイルスによるエンテロウイルス症、アデノウイルスによるアデノウイルス症、インフルエンザウイルスによるインフルエンザ、ノーウォークウイルスによる小型球形ウイルス症、Campylobacter jejuniなどによるカンピロバクター症、大腸菌による大腸菌症、Yersinia enterocolitica、Y. pseudotuberculosisによるエルシニア症、アメーバによるアメーバ赤痢などがある。

【0019】

鳥類を上記のような下痢症病原体等で免疫する際には、必要に応じてフロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)等のアジュバントを用いることもできる。免疫は、主として静脈内、皮下、筋内、腹腔内に注入することにより行われるが、経口投与、点鼻、点眼等によっても行うことができる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、1～10回の免疫を行う。通常、初回免疫から数週間で投与抗原に対して特異的に反応する抗体が卵、特に卵黄中に得られる。接種する抗原量はタンパク質量で、0.01～10mgが好適に用いられる。

【0020】

卵中の抗体価は、酵素免疫吸着法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ、凝集抗体法又は中和反応等を用いて測定することができ、免疫後に2週程度の間隔で抗体価を測定することにより抗体価の推移を追跡できる。通常、約4ヶ月間にわたって高抗体価を得ることができる。なお、免疫後、抗体価の減少が見られた場合、適当な間隔で適宜追加免疫することにより抗体価を高く維持することができる。

【0021】

本発明においては、上記のように免疫した鶏の卵及びその処理物を使用して、抗下痢症組成物、医薬組成物、家畜飼料及び食品等を製造する。本発明において、卵の処理物は、抗原として鳥類の免疫に使用した下痢症病原体等に対する抗体を含むものであれば特に制限されず、例えば、免疫した卵の全卵、卵黄及び卵白、これらの卵液及び溶液、並びに卵液をプロパノールやクロロホルムを用いて抽出した抽出物等が含まれる。含まれる抗体の量の観点から、卵黄成分を含むことが好ましい。スプレードライ法や凍結乾燥法などにより粉末化したものも含まれる。また、卵黄からヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ポリエチレングリコール、デキストラン硫酸、プロパノール、エタノール及びヘキサン等の有機溶剤などを用いる方法により卵黄脂質成分を除去した後粉末化したものも含まれる。このような粉末をペースト状又は液体状にしたものも含まれる。さらに、本発明において卵の処理物は、硫酸アンモニウム塩析、硫酸ナトリウム塩析、低温エタノール沈殿法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法により卵から精製された抗体自体をも意味する。本発明において、このように調製された抗体を鶏卵抗体という。処理物の保存性を高めるためには、殺菌した全卵液卵又は卵黄液卵をスプレードライ又は凍結乾燥して粉末化するのが好ましい。

【0022】

本発明では、下痢症に罹患した動物に、上記のようにして得られた卵及び卵処理物とともに

に生菌剤を同時に与えると、下痢の症状並びにこれに伴う嘔吐及び体重減少等の症状が効果的に軽減することを見出した。

【0023】

本発明において生菌剤とは、生きた細菌、酵母及び真菌を意味し、当技術分野における通常の方法で製造できる。本発明において好ましく使用される生菌剤としての細菌には、特に限定されないが、例えば、ラクトバチルス属、ストレプトコッカス属に属する細菌などの乳酸菌、クロストリジウム属、ビフィドバクテリウム属に属する細菌などの有用腸内細菌、その他、エンテロコッカス属、ラクトコッカス属、バチルス属に属する細菌などが含まれる。生菌剤としての酵母には、カンジダ属、ピチア属に属する酵母が含まれる。生菌剤としての真菌には、特に限定されないが、例えば、アスペルギルス属、サッカロミセス属に属する真菌が含まれる。本発明においては、特に、ラクトバチルス属、ストレプトコッカス属、ラクトコッカス属、ビフィドバクテリウム属、クロストリジウム属、バチルス属、エンテロコッカス属に属する細菌、カンジダ属に属する酵母、アスペルギルス属、サッカロミセス属に属する真菌を用いるのが好ましい。これらの生菌剤は、単独で用いてもよく、又は複数種を混合して用いてもよい。

【0024】

本発明において使用するのに好ましい生菌剤として、より具体的には、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・サリバリウス、ラクトバチルス・ガセリ、ラクトバチルス・ファーマンタム、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・ユーグルティ、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ラクトコッカス・ラクチス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ブレヴェ、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・サーモフィルム、クロストリジウム・ブチリカム、バチルス・セレウス、エンテロコッカス・フェカリス、エンテロコッカス・フェシウム、カンジダ・アルビカンズ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルスオリゼー、サッカロミセス・セレビシエ等が挙げられる。例えば、ラクトバチルス・アシドフィルスとビフィドバクテリウム・ビフィダムとエンテロコッカス・フェカリス、ラクトバチルス・サリバリウスとビフィドバクテリウム・サーモフィルム、ストレプトコッカス・サーモフィルスとビフィドバクテリウム・シュードロンガムを組み合わせ使用するのが好ましい。また、ウイルス、特に、ロタウイルス及びパルボウイルスを病原体とする下痢症には、生菌剤として有用腸内細菌、特にビフィドバクテリウム属の細菌を使用するのが好ましく、細菌を病原体とする下痢症には、生菌剤としてラクトバチルス属の細菌を使用するのが好ましい。特に、エシェリキア属の細菌を病原体とする下痢症には、生菌剤としてバチルス属の細菌を使用するのが好ましく、サルモネラ属の細菌を病原体とする下痢症には、生菌剤として有用腸内細菌、特に、ビフィドバクテリウム属の細菌を使用するのが好ましく、クロストリジウム属の細菌を病原体とする下痢症には、生菌剤として乳酸菌、特にラクトバチルス属の細菌を使用するのが好ましい。さらに、原虫、特にクリプトスポリジウム属の原虫を病原体とする下痢症には、生菌剤として乳酸菌、特にラクトバチルス属の細菌を使用するのが好ましい。

【0025】

本発明の抗下痢症組成物において、下痢症病原体で免疫した鳥類が産生する卵又はその処理物と生菌剤との混合比は、特に制限されないが、通常、卵に含まれる抗体1gに対して生菌剤 $10 \sim 10^{12}$ 個の割合、好ましくは、抗体1gに対して、生菌剤 $10^4 \sim 10^9$ 個の割合で用いられる。

【0026】

このようにして得られた、抗下痢症組成物は、上記の卵又はその処理物と生菌剤との混合物を、通常、0.001～100重量%、好ましくは0.01～10重量%の割合で含む、溶液、粉末、顆粒、錠剤又はペースト状とすることができる。そして、この抗下痢症組成物は、動物の下痢症を予防及び治療する効果を有することから、抗下痢症医薬組成物として使用することができる。また、抗下痢症組成物を、家畜の飼料及び食品に含有させることにより、下

痢症に罹患していない動物に対しても、下痢症の予防効果を有する。抗下痢症組成物は、医薬組成物、家畜の飼料及び食品に対して、通常、0.001~100重量%、好ましくは0.01~10重量%の割合で添加することができる。

【0027】

本発明の抗下痢症組成物を含む医薬組成物を製造する場合、通常の製剤化法により、そのまま又は慣用の添加剤と共に、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、液剤などの経口用製剤とすることができる。添加剤には、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、着色剤、矯味剤などがあり、必要に応じて使用する。胃での消化分解を防ぎ、小腸部位で長時間作用できるように徐放化するためには、既知の遅延剤等でコーティングすることもできる。賦形剤としては、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、寒天、軽質無水ケイ酸、ゼラチン、結晶セルロース、ソルビトール、タルク、デキストリン、デンプン、乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム、リン酸水素カルシウム等が使用できる。結合剤としては、例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、エタノール、エチルセルロース、カゼインナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、寒天、精製水、ゼラチン、デンプン、トラガント、乳糖、ヒドロキシセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。崩壊剤としては、例えば、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、結晶セルロース、デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ等が挙げられる。滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、硬化油、ショ糖脂肪酸エステル、ロウ類等が挙げられる。抗酸化剤としては、トコフェロール、没食子酸エステル、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT)、ブチルヒドロキシアニソール (BHA)、アスコルビン酸等が挙げられる。さらに、必要に応じてその他の添加剤や薬剤、例えば制酸剤 (炭酸水素ナトリウム、炭酸マグネシウム、沈降炭酸カルシウム、合成ヒドロタルサイト等)、胃粘膜保護剤 (合成ケイ酸アルミニウム、スクラルファート、銅クロロフィリンナトリウム等) を加えてもよい。

【0028】

本発明の抗下痢症組成物、並びにこれを含む医薬組成物、食品及び飼料を与える対象となる動物は、上記の下痢症病原体によって下痢症を生じうる動物であれば特に制限されず、例えば、哺乳動物、鳥類等が挙げられる。本発明の抗下痢症組成物は、ヒト、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ等の哺乳動物、並びに、鶏、鶉等の鳥類に対し好適に使用される。

【0029】

【実施例】

【実施例1】

生菌剤としてのラクトバチルス・アシドフィルスJCM-1132株を、MRS培地で培養して集菌後、凍結乾燥を行い 1×10^{10} 個/gの粉末を作成した。生菌剤としてのビフィドバクテリウム・サーモフィルムJCM-1207株を、MRS培地で培養して集菌後、凍結乾燥を行い 1×10^{10} 個/gの粉末を作成した。生菌剤としてのビフィドバクテリウム・シュードロンガムJCM-1205株を、MRS培地で培養して集菌後、凍結乾燥を行い 1×10^{10} 個/gの粉末を作成した。生菌剤としてのバチルス・コアグランスJCM-2257株を、普通寒天培地で培養して集菌後、凍結乾燥を行い 1×10^{10} 個/gの粉末を作成した。

【0030】

【実施例2】

牛ロタウイルス島根株を赤毛サル腎細胞 (MA-104) で培養し、超遠心によりウイルス粒子を集めた。このウイルス 10^9 TCID₅₀を含有する溶液とフロイントアジュバントとを乳化し、12週齢の雌鶏の左右の胸筋に1mlずつ注射することにより、1回目の免疫を行った。同様にして、6週間後に2回目の免疫を行った。2回目の免疫から2週間後、この鶏の血液中の抗ロタウイルス抗体の中和反応によって測定した抗体価 (Arch. Virol., 69:49-60, 1981) は、6400倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は6400倍であった。この抗体価は4ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末を作成した。この粉末の抗体価は6400

10

20

30

40

50

倍であった。

【0031】

この抗牛ロタウイルス抗体と生菌剤を混合した飼料を用いて、牛ロタウイルス実験感染 (Archives Virology 138:143-148, 1994) に対する効果を検討した。供試動物は1日齢の新生牛とし、3200倍抗体価の抗体を含むミルク及び生菌剤としてのビフィドバクテリウム・サーモフィラムJCM-1207株 1×10^6 個を含むミルクを、別々に又は混合して10日間投与した。また、生菌剤 1×10^6 個と上記の1/10量又は1/100量の抗体との混合物を同様に投与した。牛ロタウイルス島根株の感染は 1×10^{10} TCID₅₀とし、各群4頭づつ6群に割付け設定した。すなわち、抗体単独投与群 (3200倍)、生菌剤単独投与群 (10^6 個/g)、生菌剤 10^6 個/gに抗体を3200倍、320倍、32倍で混合して投与した群について試験した。また何も投与しない対照群についても試験した。また感染後の観察期間は、10日間とした。抗体は、腸管粘膜を保護してロタウイルスが粘膜に付着するのを防御すると考えられる。生菌剤は、腸内菌叢を整え、下痢症状を改善させると考えられる。検査として、毎日の臨床観察、ウイルス排泄期間及び増体重の測定を実施した。結果を表1に示す。下痢及び嘔吐の軽減、ウイルス排泄の軽減及び増体重において、抗体と生菌剤の混合物を投与した群で、著しい改善効果が認められた。また、生菌剤と1/100量の抗体との混合物を投与した群でも、抗体単独を投与した群と同等以上の効果が得られた。

【0032】

【表1】

抗牛ロタウイルス抗体と生菌剤

試験群	対照群	抗体 3200倍	生菌剤 10^6 個	抗体+生菌剤 3200倍+ 10^6 個	抗体+生菌剤 320倍+ 10^6 個	抗体+生菌剤 32倍+ 10^6 個
死亡率 (%)	0	0	0	0	0	0
下痢発症率 (%)	100	100	100	0	25	50
臨床スコアの合計	13	12	12	0*	3*	12
感染10日間の増体重率 (%)	-8	-1*	-2*	4**	2**	0*
ウイルス排泄期間 (日)	8	5*	7	2**	3*	4*

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

【0033】

[実施例3]

犬パルボウイルスCp83016株をネコ腎細胞 (CRFK) で培養し、超遠心によりウイルス粒子を集めた。このウイルス 10^9 TCID₅₀を含有する溶液とフロイントアジュバントとを乳化し、12週齢の雌鶏の左右の胸筋に1mlずつ注射することにより1回目の免疫を行った。同様に、6週間後に2回目の免疫を行った。2回目の免疫から2週間後、この鶏の血液中の抗パルボウイルス抗体の中和反応によって測定した抗体価 (J. Vet. Med. Sci., 60:973-974, 1998) は、50,000倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は50,000倍であった。この抗体価は4ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末を作成した。この粉末の抗体価は51,200倍であった。

【0034】

この抗犬パルボウイルス抗体と生菌剤を混合した飼料を用いて、犬パルボウイルス実験感染 (J. Virology, 68:4506-4513, 1994) に対する効果を検討した。供試動物は3週齢の幼犬

とし、25,600倍抗体価の抗体を含むミルクと生菌剤としてのビフィドバクテリウム・シュードロンガムJCM-1205株 1×10^6 個を含むミルクを、別々に又は混合して14日間投与した。また、生菌剤 1×10^6 個と上記の1/10量又は1/100量の抗体との混合物を同様に投与した。犬パルボウイルスCp83016株の感染は、 6×10^8 TCID₅₀とし、各群3頭ずつ6群に割付け設定した。すなわち、抗体単独投与群（25600倍）、生菌剤単独投与群（ 10^6 個/g）、生菌剤 10^6 個/gに抗体を25600倍、2560倍、256倍で混合して投与した群について試験した。また何も投与しない対照群についても試験した。また感染後の観察期間は、14日間とした。抗体は、腸管粘膜を保護してパルボウイルスが粘膜に付着するのを防御すると考えられる。生菌剤は、腸内菌叢を整え、下痢症状を改善させると考えられる。検査として、毎日の臨床観察、ウイルス排泄期間及び増体重の測定を実施した。結果を表2に示す。下痢及び嘔吐の軽減、ウイルス排泄の軽減及び増体重において、抗体と生菌剤の混合物を投与した群で改善効果が認められた。また、生菌剤と1/100量の抗体との混合物を投与した群でも、抗体単独を投与した群と同等以上の効果が得られた。

【0035】

【表2】

抗犬パルボウイルス抗体と生菌剤

試験群	対照群	抗体 25600倍	生菌剤 10^6 個	抗体+生菌剤 25600倍+ 10^5 個	抗体+生菌剤 2560倍+ 10^5 個	抗体+生菌剤 256倍+ 10^5 個
下痢発症率(%)	100	67	100	0	0	33
下痢発症期間 (日)	3	2	2	0**	0**	1
臨床スコアの 合計	7	3	5	0**	0**	2*
感染14日間の 増体重(kg)	-0.1	0.2**	0.1	0.3**	0.2**	0.2**
ウイルス排泄 期間(日)	12	7**	10	6**	6**	7**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

【0036】

[実施例4]

豚由来大腸菌8199株（F18付着線毛保有）をMINCA培地で培養し、遠心により菌体を集め、60℃加熱抽出によりF18付着線毛を抽出した（Vet. Microbiol., 45:281-295, 1995）。このF18付着線毛0.5mg/mlを含有する溶液とフロイントアジュバントとを乳化し、12週齢の雌鶏の左右の胸筋に1mlずつ注射することにより、1回目の免疫を行った。同様に、6週間後に2回目の免疫を行った。2回目の免疫から2週間後、この鶏の血液中の抗F18線毛抗体の凝集抗体法によって測定した抗体価は、2560倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は2560倍であった。この抗体価は4ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末を作成した。この粉末の抗体価は2560倍であった。

【0037】

この抗F18線毛抗体と生菌剤を混合した飼料を用いて、豚大腸菌実験感染（J. Vet. Med. Sci., 59:917-921, 1997）に対する効果を検討した。供試動物は4週齢の離乳豚とし、飼料に、10倍抗体価の抗体及び生菌剤としてのバチルス・コアグランスJCM-1132株 1×10^4 個/gを、別々又は一緒に混合して10日間投与した。また、生菌剤 1×10^4 個/gと上記の1/10量

又は1/100量の抗体との混合物を同様に投与した。豚由来大腸菌8199株の感染は 1×10^{11} 個とし、各群10頭づつ6群に割付け設定した。すなわち、抗体単独投与群（10倍）、生菌剤単独投与群（ 10^4 個/g）、生菌剤 10^4 個/gに抗体を10倍、1倍、0.1倍で混合して投与した群について試験した。また何も投与しない対照群についても試験した。また感染後の観察期間は、10日間とした。抗体は、腸管粘膜を保護してF18線毛保有大腸菌が粘膜に付着するのを防御すると考えられる。生菌剤は、腸内菌叢を整え、下痢症状を改善させると考えられる。検査として、毎日の臨床観察、攻撃大腸菌の分離率及び増体重の測定を実施した。結果を表3に示す。下痢及び嘔吐の軽減、攻撃大腸菌の分離率の軽減及び増体重において、抗体と生菌剤を投与した群で著しい改善効果が認められた。また、生菌剤と1/100量の抗体との混合物を投与した群でも、抗体単独を投与した群と同等以上の効果が得られた。

【0038】

【表3】

抗豚由来大腸菌抗体と生菌剤

試験群	対照群	抗体 10	生菌剤 10^4 個	抗体+生菌剤 10倍+ 10^4 個	抗体+生菌剤 1倍+ 10^4 個	抗体+生菌剤 0.1倍+ 10^4 個
死亡率 (%)	0	0	0	0	0	0
臨床スコアの合計	13	12	12	0*	4*	6
感染3日目の 臨床スコア (%)	40	20	30	10*	10*	10*
感染3日目の 攻撃菌分離率 (%)	90	70	80	30**	40*	50
感染10日間の 増体重 (%)	52	52	52	80**	75**	60

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

【0039】

【実施例5】

Salmonella dublin 256株をルリア・ブローズ培地で培養し、遠心により菌体を集めた。この菌体 10^{10} 個を含有する溶液とフロイントアジュバントとを乳化し、12週齢の雌鶏の左右の胸筋に1mlずつ注射することにより1回目の免疫を行った。同様にして、6週間後に2回目の免疫を行った。2回目の免疫から2週間後、この鶏の血液中の抗サルモネラ抗体の凝集抗体法によって測定した抗体価は、2560倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は2560倍であった。この抗体価は4ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末を作成した。この粉末の抗体価は2560倍であった。

【0040】

この抗サルモネラ抗体と生菌剤を混合した飼料を用いて、牛サルモネラ実験感染 (Am. J. Vet. Res., 59:81-85, 1998) に対する効果を検討した。供試動物は1日齢の新生牛とし、2560倍抗体価の抗体を含むミルク及び生菌剤としてのビフィドバクテリウム・サーモフィルムJCM-1207株 1×10^6 個を含むミルクを、別々に又は混合して10日間投与した。また、生菌剤 1×10^6 個と上記の1/10量又は1/100量の抗体との混合物を同様に投与した。牛由来Salmonella dublin 256株の感染は、 1×10^{11} 個とし、各群5頭づつ6群に割付け設定した。すなわち、抗体単独投与群（2560倍）、生菌剤単独投与群（ 10^6 個/g）、生菌剤 10^6 個/gに抗体を2560倍、256倍、26倍で混合して投与した群について試験した。また何も投与しない対照群についても試験した。また感染後の観察期間は、10日間とした。抗体は、腸管粘

膜を保護してサルモネラが粘膜に付着するのを防御すると考えられる。生菌剤は、腸内菌叢を整え、下痢症状を改善させると考えられる。検査として、毎日の臨床観察を実施した。結果を表4に示す。下痢及び嘔吐の軽減において、抗体と生菌剤を投与した群で著しい改善効果が認められた。また、生菌剤と1/100量の抗体との混合物を投与した群でも、抗体単独を投与した群と同等以上の効果が得られた。

【0041】

【表4】

抗サルモネラ抗体と生菌剤

試験群	対照群	抗体 2560	生菌剤 10 ⁶ 個	抗体+生菌剤 2560倍+10 ⁶ 個	抗体+生菌剤 256倍+10 ⁵ 個	抗体+生菌剤 26倍+10 ⁶ 個
死亡率 (%)	100	40	60	0**	0**	20*
感染3日目の臨床 スコア (%)	100	60	60	20*	30*	50

*: P<0.05, **: P<0.01

【0042】

[実施例6]

Clostridium perfringens PB6株をブルセラ・ブローズ培地で培養し、遠心により菌体を集めた。この菌体 1×10^{10} 個/mlを含有する溶液とフロイントアジュバントとを乳化し、12週齢の雌鶏の左右の胸筋に1mlずつ注射することにより1回目の免疫を行った。同様にして、6週間後に2回目の免疫を行った。2回目の免疫から2週間後、この鶏の血液中の抗体の凝集抗体法によって測定した抗体価は、640倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は640倍であった。この抗体価は4ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末を作成した。この粉末の抗体価は640倍であった。

【0043】

この抗クロストリジウム抗体と生菌剤を用いてマウスクロストリジウム実験感染に対する効果を検討した。供試動物は4週齢のBALB/cマウスとし、32倍抗体価の抗体と生菌剤としてのラクトバチルス・アシドフィルスJCM-1132株 1×10^5 個を、別々に又は混合して3日間投与した。また、生菌剤 1×10^5 個と上記の1/10量又は1/100量の抗体との混合物を同様に投与した。Clostridium perfringens PB6株の感染は 1×10^7 個とし、各群10頭づつ6群に割付け設定した。すなわち、抗体単独投与群（32倍）、生菌剤単独投与群（ 10^5 個/g）、生菌剤 10^5 個/gに抗体を32倍、3倍、0.3倍で混合して投与した群について試験した。また何も投与しない対照群についても試験した。また感染後の観察期間は、14日間とした。抗体は、腸管粘膜を保護してクロストリジウムが粘膜に付着するのを防御すると考えられる。生菌剤は、腸内菌叢を整え、下痢症状を改善させると考えられる。検査として、毎日の臨床観察を実施した。結果を表5に示す。死亡率の軽減において、抗体と生菌剤を投与した群で著しい改善効果が認められた。また、生菌剤と1/100量の抗体との混合物を投与した群でも、抗体単独を投与した群と同等以上の効果が得られた。

【0044】

【表5】

抗クロストリジウム抗体と生菌剤

試験群	対照群	抗体 32倍	生菌剤 10 ⁵ 個	抗体+生菌剤 32倍+10 ⁵ 個	抗体+生菌剤 3倍+10 ⁵ 個	抗体+生菌剤 0.3倍+10 ⁵ 個
死亡率 (%)	80	40	60	0**	20*	30*

* : P<0.05、** : P<0.01

【0045】

10

[実施例7]

Cryptosporidium parvum Mito株のオーシストをSCIDマウスに経口感染させ、糞便及び腸管内容物を集め、メロゾイドを精製した。このメロゾイド0.5mg/mlを含有する溶液とフロイントアジュバントとを乳化し、12週齢の雌鶏の左右の胸筋に1mlずつ注射することにより1回目の免疫を行った。同様に、6週間後に2回目の免疫を行った。2回目の免疫から2週間後、この鶏の血液中の抗体の蛍光抗体法によって測定した抗体価は、6400倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は6400倍であった。この抗体価は4ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末を作成した。この粉末の抗体価は6400倍であった。

【0046】

20

この抗クリプトスポリジウム抗体と生菌剤を混合した溶液を用いてマウスクリプトスポリジウム実験感染に対する効果を検討した。供試動物は4週齢のSCIDマウスとし、20倍抗体価の抗体と生菌剤としてのラクトバチルス・アシドフィルスJCM-1132株1×10⁵個/gを、別々又は混合して27日間投与した。また、生菌剤1×10⁵個/gと上記の1/10量又は1/100量の抗体との混合物を同様に投与した。

【0047】

30

Cryptosporidium parvum Mito株の感染は1×10⁷個とし、各群6頭ずつ6群に割付け設定した。すなわち、抗体単独投与群（20倍）、生菌剤単独投与群（10⁵個/g）、生菌剤10⁵個/gに抗体を20倍、2倍、0.2倍で混合して投与した群について試験した。また何も投与しない対照群についても試験した。また感染後の観察期間は、27日間とした。抗体は、腸管粘膜を保護してクリプトスポリジウムが粘膜に付着するのを防御すると考えられる。生菌剤は、腸内菌叢を整え、下痢症状を改善させると考えられる。検査として、毎日の臨床観察及び攻撃菌排泄量の測定を実施した。結果を表6に示す。攻撃菌の排泄量の軽減において、抗体と生菌剤を投与した群で著しい改善効果が認められた。また、生菌剤と1/100量の抗体との混合物を投与した群でも、抗体単独又は生菌剤単独を投与した群と同等以上の効果が得られた。

【0048】

【表6】

抗クリプトスポリジウム抗体と生菌剤

	糞便よりオーシストの排泄量(個)				
	0日目	12日目	17日目	22日目	27日目
対照	0	50,000	100,000	500,000	1,000,000
抗体 20倍	0	1,000*	10,000*	50,000*	500,000
生菌剤 10 ⁵ 個	0	10,000	50,000	100,000	500,000
抗体+生菌剤 20倍+10 ⁵ 個	0	100**	500**	1,000**	10,000**
抗体+生菌剤 2倍+10 ⁵ 個	0	500**	1,000**	5,000**	50,000**
抗体+生菌剤 0.2倍+10 ⁵ 個	0	1,000*	5,000*	10,000*	100,000*

*: P<0.05、**: P<0.01

【0049】

本発明の抗体と生菌剤を含む抗下痢症組成物を、飼料、食品又は医薬品に混ぜて、下痢症病原体の実験感染動物に給与したところ、抗体を単独で投与した動物群より、生菌剤と混合して投与した動物群の方が、有意に発症軽減及び増体重効果が見られた。また、生菌剤に抗体を少量投与した場合でも、相乗効果により発症軽減及び増体重効果が見られた。

【0050】

【発明の効果】

本発明における抗下痢症抗体と生菌剤を含む抗下痢症組成物は、下痢症病原体に対して特異的に作用するので、動物の下痢症に対して、ワクチン又は抗生物質よりも極めて優れた予防効果を発揮するとともに、下痢症に特有の下痢、嘔吐及び体重減少等の症状を軽減し、極めて有効な下痢症予防薬及び治療薬として使用できる。また、抗生物質等のように、耐性菌が発生するという問題もない。

10

20

30

 フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 39/08	A 6 1 K 35/74	A
A 6 1 K 39/108	A 6 1 K 39/08	
A 6 1 K 39/112	A 6 1 K 39/108	
A 6 1 K 39/15	A 6 1 K 39/112	
A 6 1 K 39/23	A 6 1 K 39/15	
A 6 1 P 1/12	A 6 1 K 39/23	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 1/12	
	A 6 1 P 1/12	1 7 1
	A 6 1 P 43/00	1 2 1

F ターム (参考) 2B150 AA01 AB10 AC06 AD04 AE05 AE34 AE36 AE40 AE46 AE49
 DD01 DD15 DJ01 DJ10 DJ11
 4B018 MD72 MD86 MD87 ME09 ME11 MF02 MF13
 4C085 AA13 BA12 BA21 BA24 BA56 BA75 CC07 CC08 CC26 DD21
 EE03 GG08
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB61 BC58 BC59 CA09 MA02 MA52 NA14
 ZA73 ZC61 ZC75